Aus der Kinderklinik der Universität Breslau
Vorstand: **Prof. Dr. Stolte**

Beiträge zur Kolloidpufferung

Inaugural-Dissertation

verfasst und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Antonie Lowag
aus Frankenstein i. Schl.

Breslau 1932
Druck von Anton Schreiber, Breslau

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Breslau

I. Referent: Professor Dr. Klinke
II. = Professor Dr. Stolte

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber das Wesen und den Ablauf der Kolloidphasenpufferung sind von Klinke[1]) mehrere Arbeiten veröffentlicht worden. In ihnen kommen nicht allein Fragen der biochemischen Gesetzmäßigkeiten zur Sprache, darüber hinaus sind Methoden ausgearbeitet worden, die mit Hilfe der Kolloidphasenpufferung eine Serodiagnostik bestimmter Krankheiten ermöglichen. Von besonderer Bedeutung ist die serologische Diagnostik der aktiven Tuberkulose[2]), die in einer Mitteilung von Klinke-Hensel zur Darstellung kommt.

Die Kolloidphasenpufferung, die nach Klinke eine Fällungsverschiebung in Serum auf Säurezusatz bedeutet, ist in den bisher veröffentlichten Arbeiten nur in unverdünntem Serum untersucht worden. Die Serodiagnostik der aktiven Tuberkulose fußt ebenfalls auf der Verwendung von nativem Serum und erfordert eine ziemlich große Blutmenge (25—30 ccm).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich deshalb in erster Linie mit der Frage, wie der Ablauf der Kolloidphasenpufferung unter dem Einfuß der Verdünnung erfolgt. Wichtig war dabei der Vergleich der Tuberkulose-Reaktion nach Klinke-Hensel im verdünnten und nativen Serum. Wenn hier eine Uebereinstimmung der Ergebnisse zu erzielen war, so kann die Serodiagnostik der aktiven Tuberkulose auch in den Fällen angewandt werden, in denen nur wenig Serum zur Verfügung steht.

In zweiter Linie dient die Arbeit dem Zweck, den Ablauf der Kolloidphasenpufferung bei Zusatz von solchen Inkreten zu prüfen, die nach unserer heutigen Anschauung einen Einfluß auf den Wasser- und Kolloidhaushalt im Körper besitzen. Anschließend wird in einer Reihe von Versuchen die Wirkung der typischen chemischen Diuretika auf die Kolloidphasenpufferung dargestellt.

Um den Begriff der Kolloidphasenpufferung zu erklären, sei kurz auf die Phasenpufferung einfacher schwerlöslicher Ampholyte eingegangen, die im isoelektrischen Punkt ihre geringste Löslichkeit aufweisen und nach der basischen wie

nach der sauren Seite dissoziieren. Wenn einem einfachen schwerlöslichen Ampholyten, z. B. einer Aminosäure, wie Tyrosin oder Cystin, eine Base oder Säure zugesetzt wird, so tritt ein Ausgleich zwischen den zugesetzten OH— bzw. H+-Ionen einerseits und den entsprechenden Ionen des Ampholyten ein; die zugesetzten Ionen verschwinden aber nicht allein durch Entionisation wie bei einem löslichen Puffersalz (z. B. Natriumphosphat). Sie können auch verschwinden indem sie sich an der Bildung von Bodenkörper beteiligen, also in eine andere Phase übergehen. Diese besondere chemische Regelung der OH— bzw. H+-Ionenkonzentration wird Phasenpufferung genannt.

Bei einer Reihe höhermolekularer Eiweisstoffe hat Klinke den gleichen Vorgang der Phasenpufferung nachweisen können und bezeichnet ihn hier als Kolloid(phasen)-pufferung, weil die Eiweißkörper nicht allein die Eigenschaften eines Ampholyten, sondern auch die Merkmale einer kolloidalen Lösung aufweisen. Neben isolierten Eiweißkörpern wurden auch Eiweißgemische wie menschliches und tierisches Serum in Bezug auf ihre Kolloidphasenpufferung untersucht. Die hier auftretende Aenderung der Ionenkonzentration geht mit einer Dispersionsänderung der kolloidalen Teilchen parallel, die tyndallometrisch faßbar ist. Stellt man die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen in Kurven dar, so weisen sie zwar geringfügige Unterschiede auf, zeigen aber im wesentlichen bei den verschiedenen Seris einen sehr ähnlichen Verlauf. Eiweißkörper, die unter gleichen Bedingungen zur Untersuchung kommen und trotzdem einen besonderen Kurvenverlauf aufweisen, müssen also eine Umlagerung in ihrer Struktur erfahren haben, die mittels der angegebenen Methode festzustellen, allerdings nicht in ihrem Wesen zu ergründen ist.

Es ist möglich gewesen, Veränderungen der Serumkolloide in den Fällen festzustellen, in denen klinisch eine exsudative Diathese oder ein Nirvanolexanthem bestand. Von größerer praktischer Bedeutung ist jedoch die Tatsache, daß bei aktiver Tuberkulose die Serumkolloide bei Zusatz von Alttuberkulin Koch eine ganz andere Pufferung aufweisen als im normalen Serum. Sie kommt darin zum Ausdruck, daß die normaler Weise auftretende Serumaufhellung jenseits des isoelektrischen Punktes völlig oder fast völlig

ausbleibt. Wird das Serum gesunder Menschen oder das von Patienten mit inaktiver Tuberkulose in gleicher Weise untersucht, so werden Kurven gewonnen, die den „Normalkurven" völlig gleichen oder sich von ihnen nur durch eine Verlagerung nach unten unterscheiden.

Sämtliche Versuche sind bisher an unverdünnten Kolloiden, bzw. Kolloidgemischen, — wie menschlichem und tierischem Serum — ausgeführt worden Dabei ist die Frage offen geblieben, wie der Ablauf der Kolloidpufferung bei verdünnten Lösungen erfolgt. Chemisch stellt das Blutserum ein Kolloidgemisch dar, in dem Dispersionsmittel und disperse Phase in bestimmtem Verhältnis zueinander stehen, und dessen einzelne Teilchen eine bestimmte elektrische Ladung besitzen. Wenn ein solches Kolloidgemisch mit einer physiologischen Salzlösung versetzt wird, so muß die elektrische Ladung der Teilchen und mit ihr der Zustand des Kolloidgemisches in gewissem Ausmaße verändert werden. Die Mollekülaggregate werden eine andere Verteilung erfahren, die unter Umständen eine Dispersionsänderung der Kolloidteilchen hervorrufen kann. Es ist also durchaus möglich, daß unter dem Einfluß der Verdünnung ebenfalls Veränderungen der Kolloidpufferung ausgelöst werden. Diese Frage sollte zunächst geklärt werden. Ehe über die Verhältnisse berichtet wird, seien kurz die Methode und die angewandten Apparate besprochen.

Methodik und Apparatur.

In die Wasserkammer des Zeiß'schen Trübungsmessers wird das Gefäß mit dem zu untersuchenden Serum eingesetzt. Das von der Lichtquelle des Apparates kommende Licht gelangt durch eine Linse in die Wasserkammer und fällt hier in die Untersuchungsflüssigkeit ein. Die hier erregte Strahlung tritt durch eine zweite Linse aus der Wasserkammer heraus. Ein Teil des Lichtes strahlt von der Lichtquelle in eine zweite Wasserkammer und durchdringt hier ein trübes Glasprisma, das als Vergleichskörper für die erzielten Helligkeitswerte dient. Auch aus dieser Wasserkammer tritt das Tyndallicht durch eine Oeffnung wieder heraus. Durch Vorschalten des Pulfrich'schen Stufenphotometers ist es möglich, die in der Versuchslösung auftretenden Trübungen im Vergleich zu dem Trübungsstandart zahlenmäßig zu bestimmen.

Im Prinzip entspricht das Stufenphotometer einem Doppelfernrohr, dessen Objektivöffnungen meßbar veränderlich sind, und dessen Empfindlichkeit den Empfindungsstufen des menschlichen Auges angepaßt ist. Die Bilder der beiden Tyndallstrahlenbündel werden beim Einblick in das Ocular als zwei aneinanderstoßende Halbkreise verschiedener Helligkeit sichtbar. Durch Veränderung der Objektivöffnungen kann die Helligkeit des einen der Helligkeit des andern Halbkreises gleichgemacht werden und durch Anbringung zweier Meßtrommeln ist es möglich, die Verkleinerung, bzw. Vergrößerung, der Objektivöffnungen zahlenmäßig zu fassen.

Es verhält sich, da die Blende stets ein Quadrat darstellt,

$$\frac{100}{a} = \frac{x}{1}$$

a = abgelesene Zahl, x = Trübungseinheit.

Aus praktischen Gründen werden nicht die Trübungswerte, sondern ihre Logarithmen berechnet:

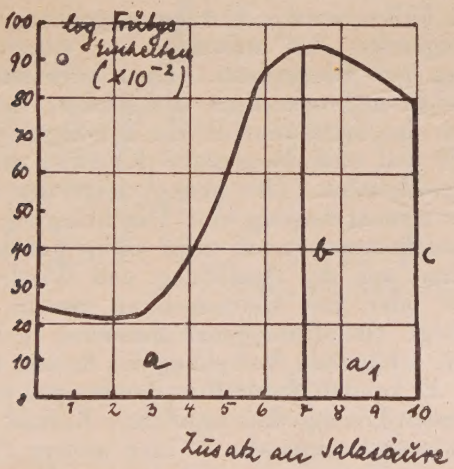
$$\log 100 - \log a = x.$$

Die Untersuchungen wurden in folgender Weise ausgeführt: das Serum wurde in einem Reagenzglas in die Wasserkammer des Prüfungsmessers eingesetzt und der erste Trübungswert bestimmt. Stets erfolgte die Ablesung unter Vorschalten des Grünfilters, das sich bei Serumuntersuchungen am besten bewährt hat. Darauf wurde dem nativen Serum 1/100 Vol. % n/1 HCl zugesetzt, halbverdünntem Serum n/2 HCl, bei dem auf den vierten Teil verdünnten Serum n/4 HCl, usw. Bei den kleinen Serummengen muß das Bürettieren mit allergrößter Genauigkeit erfolgen. Die Menge des untersuchten Serums beträgt je nach Maßgabe des vorhandenen Materials 4—10 ccm Unter 4 ccm bietet das Bürettieren mit Salzsäure erhebliche Schwierigkeiten, sodaß die Ergebnisse sehr ungenau werden. Bei Mengen über 10 ccm wird andererseits in den angewandten Reagenzgläsern das Mischen des Serums mit Salzsäure sehr erschwert, sodaß die Reaktion der beiden Agentien nicht in allen ihren Teilchen gleichmäßig erfolgen kann.

Nach Ablauf von mindestens 5 Min. wurde der neue Trübungswert des Serums abgelesen. Das Bürettieren mit Salzsäure und die folgende Bestimmung des jeweils auftretenden Tyndallphänomens erfolgte 10 mal hintereinander.

Hierbei wird, wie die Untersuchungen von Klinke[1]) ergaben, im Serum ein pH von 3—2,5 erreicht. Dies genügt, um den vom isoelektrischen Punkt aus absteigenden Kurvenanteil in Erscheinung treten zu lassen. Die Logarithmen der Untersuchungsergebnisse wurden in Kurvenform in einem Koordinatensystem eingetrageu, dessen Abszisse die Menge der zugesetzten Salzsäure und dessen Ordinate die Logarithmen der Trübungswerte angibt. Zur Veranschaulichung des Gesagten sei in Abb. 1 eine Kurve dargestellt, die nach Untersuchung von normalem tierischen Serum gewonnen ist und den typischen Verlauf zeigt: einen aufsteigenden Schenkel und einen weniger tief abfallenden Schenkel. Die Kurven sind leicht zu charakterisieren: Wird die den Scheitelpunkt der Kurve treffende Senkrechte von der Abszisse an errichtet, so kann die Breite des An- und Abstiegs in Zusatz von Salzsäure und die Höhe der Kurve in log Tr. E bestimmt werden (Tr. E. = Trübungseinheit). Errichtet man auf der Abszisse eine zweite Senkrechte, die den Endpunkt der Kurve trifft, so kann der senkrechte Abstand zwischen Endpunkt und Abszisse ebenfalls in log Tr. E. ausgedrückt werden. Es sollen bezeichnen: (vgl. Kurve)

Abbildung 1



Pufferungskurve normalen Serums.

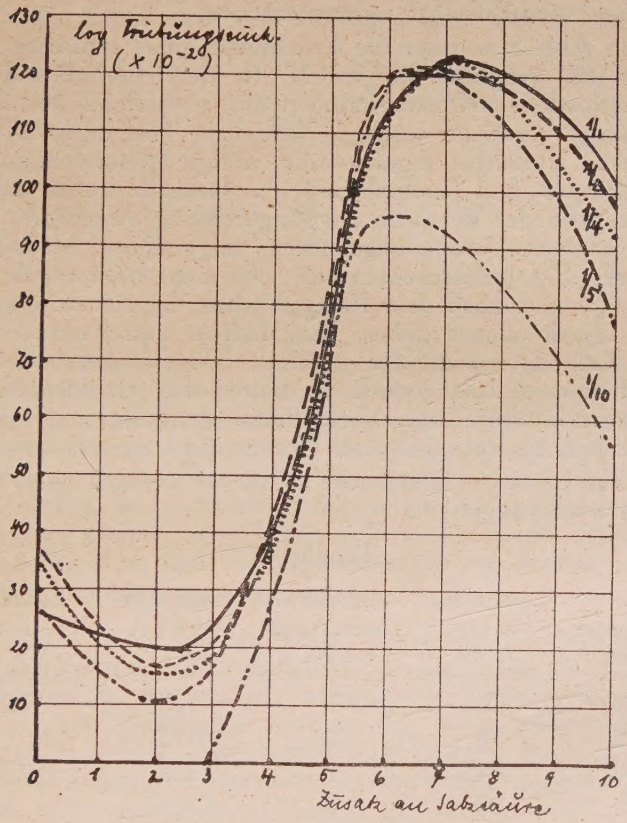
a = Breite des Anstiegs, gemessen am Zusatz von Salzsäure;
a1 = 10 — a = Breite des Abstiegs;
b = senkrechter Abstand von Scheitelpunkt und Abszisse;
c = senkrechter Abstand von Endpunkt und Abszisse, wie b in log Tr. E. ausgedrückt.

Wie eingangs erwähnt, befaßt sich die erste Untersuchungsreihe mit dem Ablauf der Kolloidpufferung im verdünnten Serum. Als Verdünnungsflüssigkeit kamen Ringerlösung sowie physiologische Kochsalz- und Glukoselösung in Betracht. Das Serum wurde auf 1/2; 1/4; 1/5; 1/10 seines Volumens verdünnt; entsprechen wurde mit n/2; n/4; n/5; n/10 HCl bürettiert. Zur Untersuchung kam menschliches und — aus Gründen der Materialbeschaffung — tierisches Serum; es muß nüchtern gewonnen werden und darf keine Hämolyse aufweisen. Eine Verdauungslipämie macht wie die Hämolyse eine Bestimmung des Tyndallphänomens unmöglich, weil die hier auftretenden Trübungen in das kritische Gebiet des Tyndallichtes fallen (näheres s. Klinke). Das zweimal zentrifugierte Serum gelangte in Reagenzgläsern von 18 mm Weite zur Untersuchung. Sie müssen aus Jenaer Glas verfertigt sein, damit bei Zusatz von Säure zum Serum keine Abspaltung von Alkalien erfolgt.

In allen Fällen werden Kurven gewonnen, die zunächst einen aufsteigenden Ast aufweisen — entsprechend der Serumtrübung auf Säurezusatz. Dem höchsten Punkt der Kurve entspricht makroskopisch die stärkste Serumtrübung, die mit dem isoelektrischen Punkt der Serumeiweißkörper zusammenfällt und nach Messungen Klinkes einen pH von 5 — 4,5 gleichkommt. Oft genug zeigt der aufsteigende Schenkel vor seinem Anstieg eine Durchbiegung nach unten, deren Zustandekommen noch nicht völlig geklärt ist, wahrscheinlich aber auf der Ausfällung und Wiederlösung von Phosphatiden oder von Calciumsalzen beruht. Dem aufsteigenden folgt ein absteigender Schenkel, gekennzeichnet durch die stets erfolgende Aufhellung des Serums bei weiterem Säurezusatz. Er kommt dadurch zustande, daß in der stärker sauer werdenden Lösung das amphotere Kolloid als Kolloidanion wieder gelöst wird, also in eine andere Phase eintritt. Eine Reihe von Versuchen wurde erst nach zweistündigem Aufenthalt der Serumproben im Brutschrank angestellt. Das

ist von praktischer Bedeutung, weil bei der Tuberkulosediagnostik das Serum erst 2 Stunden im Brustschrank verweilt, damit das Tuberkulin auf das Serum einwirken kann.

Abbildung 2



Verdünnungsversuch:

——————— natives Serum
– – – – – – – – – $^1/_2$ verdünntes Serum
..... $^1/_4$ verdünntes Serum
—.—.—.—.—. $^1/_5$ verdünntes Serum
—..—..—..—.. $^1/_{10}$ verdünntes Serum

Die Ergebnisse bei Verdünnungsversuchen sind jedoch dadurch in keiner Weise verändert worden. Unterschiede in der Kolloidpufferung zwischen menschlichem und tierischem Serum sowie zwischen den Sera der einzelnen Tierarten sind so gering, daß sie bei den angestellten Gruppenuntersuchungen praktisch vernachlässigt werden können.

In Abb. 2 werden die Ergebnisse eines typischen Versuches (66) graphisch dargestellt, in dem tierisches Serum in verschiedenen Konzentrationen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde. Zahlreiche hier nicht wiedergegebene Versuche ergaben die völlige Uebereinstimmung von „Ringer- und Kochsalzkurven". Deshalb wurde auf die Wiedergabe der Versuche mit Ringerlösung verzichtet. Jede der einzelnen Verdünnungskurven zeigt einen besonderen Verlauf. Sie unterscheiden sich also nicht bloß durch Verlagerung, wie nach dem Raleygh'schen Gesetz zu erwarten wäre. Nach diesen gehen Tyndalleffekt und Konzentration eines Kolloids aneinander parallel. Der Vergleich der einzelnen Kurven läßt jedoch vermuten, daß die Verdünnung wesentlich kompliziertere Verhältnisse geschaffen hat, die mit dem einfachen Raleygh'schen Gesetz nicht zu erfassen sind.

Zur besseren Uebersicht sei dieser Versuch auch tabellarisch wiedergegeben:

Tabelle 1

Verdünnungsfaktor	Anfangspunkt in log Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz von HC1	Höhepunkt in log Tr. E.	Endpunkt in log Tr. E.
nativ	26	7	123	102
1/2	36	6	121	77
1/4	34	7	124	92
1/5	26	6	121	77
1/10	— 4	6	96	56

Es ist von Bedeutung, daß zwar die Verdünnung mit Ringer- und Kochsalzlösung sehr ähnliche Kolloidumlagerungen hervorruft, daß aber im Gegensatz dazu die Glukoseverdünnung wieder andere Reaktionen auslöst. Hier wurde dasselbe Serum wie im Versuch 66 mit physiologischer Glukoselösung verdünnt.

Die Tabelle zeigt deutlich, daß mit zunehmender Verdünnung der Kurvenhöhepunkt immer mehr nach oben rückt und die nachfolgende Aufhellung immer stärker wird.

Tabelle 2

bringt die Ergebnisse von Versuch 67 zur Darstellung:

Verdünnungsfaktor	Anfangspunkt in log Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz von HC1	Höhepunkt in log Tr. E.	Endpunkt in log Tr. E.
nativ	42	6	117	82
1/2	49	5	128	32
1/4	71	5	149	38
1/5	40	5	152	09
1/10	41	5	159	00

Die eben besprochenen Versuche bringen einen Hinweis darauf, daß die sogenannten physiologischen Lösungen keinen vollwertigen Ersatz für die Körperflüssigkeiten bilden. Andernfalls wäre es unmöglich, daß das Gleichgewicht der Serumkolloide durch den Zusatz der Verdünnungsflüssigkeiten derart gestört wird. In sämtlichen serologischen Versuchen, in denen verdünntes Serum verwendet wird, darf also nie außer acht gelassen werden, daß die Serumkolloide von Anfang an bestimmte Umlagerungen erleiden.

Auffällig ist der annähernd gleiche Verlauf der „Kochsalz- und Ringerkurven“ einerseits und der davon abweichende Verlauf der „Glukosekurven“ andererseits. Diese Unterschiede sind zu der elektrischen Ladung der Serumkolloide in Beziehung zu setzen. Die beiden Salzlösungen besitzen durch die elektrolytische Dissoziation ein bestimmtes Eigenpotential, das zu dem elektrischen Potential der Serumkolloide hinzutritt. Praktisch bleiben also die elektrischen Potentiale des Serums bei Verdünnung mit den beiden Salzlösungen gleich. Anders verhält sich die Glukoselösung. Mangels einer elektrolytischen Dissoziation fehlt hier das Eigenpotential. Bei Zusatz von Glukoselösung zum Serum kommt es also zu einer Verdünnung der elektrischen Ladung der Serumkolloide, die ihrerseits eine erhöhte Labilität der einzelnen Eiweißphasen nach sich zieht.

Trotz der Kolloidverschiebungen, wie sie bei Verdünnung des Serums mit pbysiologischer Kochsalzlösung auftreten, bieten die verschiedenen Kurven in ihrem Verlauf keine wesentlichen Unterschiede. Vor allem sind die Kurven, die bei halb mit Kochsalzlösung verdünntem Serum gewonnen werden, den Nativkurven sehr ähnlich, wie dies in zahlreichen Kontrollversuchen zum Ausdruck kam. Diese Tatsache ließ vermuten, daß die Serodiagnostik der aktiven Tuberkulose nach Klinke-Hensel auch mit halbverdünntem Serum möglich wäre. In dieser Richtung wurden die folgenden Versuche angestellt.

Die Kolloidpufferung im halbverdünnten Serum von Tuberkulösen.

Die Seroreaktion nach Klinke-Hensel beruht auf den Fällungsverschiebungen, wie sie im Serum von Menschen, die an einer aktiven Tuberkulose leiden, durch das Alttuberkulin Koch ausgelöst werden. Sie verändern die Kolloidpufferung insofern, als, wie schon oben erwähnt, beim 6.—7. Säurezusatz keine Aufhellung, sondern recht häufig sogar eine erhöhte Trübung des Serums zustande kommt. Dementsprechend bleibt die Kurve der Abszisse parallel und läßt den gewohnten Abfall vermissen, bzw. es tritt eine Kreuzung mit der Kontrollkurve ein. Vermutlich handelt es sich bei dieser Ausfällungs- oder Löslichkeitsbehinderung um höchst labile Anlagerungsvorgänge von irgend welchen Spaltprodukten der Tuberkelbazillen an die Serumkolloide und nicht um elektrochemische Bindungen dieser Körper. Diese führen im kolloidchemischen Sinne zu einer Stabilisierung der Kolloide. Mit der Dispersion der Serumkolloide bei Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung konnten sich auch diese Anlagerungsvorgänge ändern. Deshalb war es nötig, in besonderen Versuchen die Methode von Klinke-Hensel in verdünntem Serum zu prüfen. Die angestellten Untersuchungen sind nicht so zahlreich wie die eben besprochenen. Einerseits war das Verhalten der Kolloide in verdünntem Serum bereits geklärt, andererseits stand nur wenig Material zur Verfügung. Immerhin reicht die Zahl der Versuche aus, um das Verhalten von verdünntem Serum bei Tuberkulinzusatz zu bestimmen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Das Serum wurde zur Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und

zu gleichen Teilen in 2 Reagenzgläser gefüllt. Zu der einen Blutprobe wurde 1/50 Vol. % Alttuberkulin Koch hinzugefügt. Dieses Verhältnis hat K l i n k e in Vorversuchen als das beste ermittelt. Beträgt der Zusatz mehr als 1/50 Vol. %, so verläuft die Reaktion nicht mehr typisch, weil durch den hohen Lipoidgehalt des Tuberkulins eine unspezifische Reaktion hervorgerufen werden kann. Zum Zweck der Kontrolle mußte gleichzeitig Nativserum untersucht werden. Das zur Untersuchung kommende Serum wurde nach dem Tuberkulinzusatz zwei Stunden im Brutschrank belassen, damit die Reaktion zwischen Tuberkulin und Serum erfolgen konnte.

Tabelle 3

gibt einige typische Untersuchungsergebnisse an.

No.	Diagnose	Verdünnungsfaktor	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in log. Tr. E.	Endpunkt in log. Tr. E.
1	Pleuritis exsud. Tbc. AT +	1/1	46	7	103	102
		1/1 + Tb	46	10	109	109
		1/2	25	6	117	109
		1/2 + Tb	25	9	101	100
2	Mening. Tbc.	1/1	30	6	128	117
		1/1 + Tb	40	6	118	117
		1/2	22	6	135	121
		1/2 + Tb	39	6	127	125
3	Miliare Tbc. in extremis	1/1	91	7	129	124
		1/1 + Tb	91	10	121	121
		1/2	89	8	138	136
		1/2 + Tb	87	10	130	130
4	Bronchiectasien AT —	1/1	64	7	133	117
		1/1 + Tb	34	7	128	110
		1/2	64	6	136	117
		1/2 + Tb	34	6	135	110

No.	Diagnose	Verdünnungsfaktor	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in log. Tr. E.	Endpunkt in log. Tr. E.
5	Grippe-Pneumonie AT +	1/1	60	6	138	104
		1/1 + Tb	60	6	122	102
		1/2	30	6	146	98
		1/2 + Tb	30	6	122	98
6	Diarrhoe	1/1	42	5	143	117
		1/1 + Tb	41	5	136	115
		1/2	34	5	143	114
		1/2 + Tb	39	6	136	112
7	Exsud Pleuritis Tbc.	1/1	46	7	58	56
		1/1 + Tb	46	10	64	64
		1/2	35	6	91	76
		1/2 + Tb	34	8	76	75

Der positive Ausfall der Reaktion wie in Tab. 3, 1—3,7 wird kenntlich an einer Verbreiterung des Anstiegs, die in manchen Fällen einem zehnfachen Zusatz von Salzsäure entspricht. Damit fallen also Scheitel- und Endpunkt der Kurve zusammen. In den negativen Fällen gehen die beiden Kurven einander parallel und die mit Tuberkulin versetzte zeigt ebenfalls einen deutlichen Abfall. Wie man aus den Zahlen ersehen mag, ist der Kurvenverlauf auch in der Verdünnung so charakteristisch wie in den unverdünnten Seris. Gleiche Resultate wurden in weiteren 24 vergleichenden Untersuchungen gewonnen. Mit dieser Zahl scheint der sichere Nachweis erbracht, daß die Klinke-Henselsche Reaktion auch in Verdünnungen anwendbar ist.

Anmerkung. Im Anschluß an die Tuberkuloseversuche wurde eine andere Infektionskrankheit, die Diphterie, auf ihre serologische Reaktionsbereitschaft hin untersucht. Aus früheren Arbeiten Klinkes[3]) ist bekannt, daß in einem antitoxischen Serum bei Bindung von Toxin eine verminderte Fällbarkeit von Euglobulin auftritt. Es war also anzunehmen, daß wie bei der Tuberkulose auch hier die veränderte Fällbarkeit sich im Ablauf der Kolloidpufferung ausprägen konnte.

Nur zwei leichte Fälle nicht behandelter Diphterie sind der Untersuchung zugänglich gewesen. Nach Zusatz von 1/50 Vol. % Diphtherietoxin blieb die Kolloidpufferung unverändert. Es ist anzunehmen, daß in den betreffenden Seris die Bindung von Toxin an das Antitoxin wohl stattgefunden hat, aber so geringgradig war, daß die Fällbarkeit des Euglobulins nur wenig beeinflußt wurde. Dem zufolge blieb die Kolloidpufferung unverändert.

Schwere Fälle von Diphterie sind der Untersuchung bisher noch nicht zugänglich gewesen. Deshalb wurde noch eine Reihe von Versuchen mit Diphterie-Immunserum angestellt, in denen das Serum nativ, halb und einviertel verdünnt mit Toxin versetzt wurde und die sämtlich ergebnislos verlaufen sind. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, daß durch die Art der Herstellung das Serum derart verändert ist, daß die Kolloidpufferung nicht mehr nach den von Klinke ermittelten Gesetzen abläuft. Dementsprechend sind die Kurven sehr unregelmäßig und diagnostisch nicht verwertbar. Hinzu kommt, daß die von vornherein bestehende Serumtrübung ähnlich wie bei der Verdauungslipämie eine genaue Messung des Tyndallichtes unmöglich macht.

Versuche über den Ablauf der Kolloidpufferung bei Zusatz von Inkreten.

Die folgenden Versuche dienten dazu, den Ablauf der Kolloidpufferung im Serum bei Zusatz von innersekretorischen Stoffen zu prüfen. Es bestand die Möglichkeit, daß, ähnlich dem Tuberkulin im abgestimmten Serum, auch die Inkrete den Zustand der Serumkolloide verändern. In erster Linie interessierten Inkrete, deren Einfluß auf den Wasserhaushalt des Körpers bekannt ist: Hypophysenpräparate, Adrenalin, Thymogladol, Thyroxin. Man kann sich vorstellen, daß diese Stoffe — vielleicht durch Quellung oder Entquellung — an den Serumkolloiden angreifen: dann könnte eine bestimmte Kurvenform davon Zeugnis geben.

In allen Fällen wurde mit Verdünnungen gearbeitet und physiologische Glukose — sowie Kochsalzlösung als Verdünnungsflüssigkeit benutzt. Ein Teil des Serums wurde zur Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung, der zweite Teil mit physiologischer Glukoselösung verdünnt. Der dritte

und vierte Teil des Serums wurden ebenfalls entsprechend verdünnt, aber außerdem mit 1/50 Vol. % des betreffenden Inkretes versetzt. Alle Serumproben verweilten erst im Brutschrank, ehe sie zur Untersuchung kamen.

Hypophysenversuche: Der Vergleich der Pituglandol — mit den reinen Verdünnungskurven ergibt, daß sie einander nahezu decken. Die geringgradigen Unterschiede sind durch kleine Differenzen der Reagenzgläser und der Titration mit Salzsäure zu erklären. Aehnlich verlaufen die Hypophenkurven. Bei dem Hypophysinkurven fällt eine Aenderung auf: Der Endpunkt der Kurve liegt um 4—6 log. Tr. E. höher als bei reinen Verdünnungskurven. Ein prinzipieller Unterschied zwischen Inkret- und Verdünnungskurven ist darin aber nicht zu erblicken. Diese Tatsache läßt sich dahin erklären, daß die durch Hypophysenpräparate gesetzten Veränderungen entweder überhaupt nicht an den Serumkolloiden angreifen oder aber vermittels der Kolloidpufferung nicht faßbar sind.[4])

Tabelle 4

gibt einen Ueberblick über einen Teil der Versuche.

No.	Verdünnungsmittel	Art des Präparates	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in lg. Tr. E	Endpunkt in lg. Tr. E	Zusatz des Präparates
2	Kochsalzlösung	Pituglandol	9	6	131	59	—
	=	=	9	6	136	64	+
	Glukoselösung	=	9	5	124	40	—
	=	=	12	5	129	40	+
4	Kochsalzlösung	Hypophen	32	5	131	85	—
	=	=	29	6	131	94	+
	Glukoselösung	=	33	5	131	61	—
	=	=	33	6	133	60	+
5	Kochsalzlösung	Hypophysin	1	5	88	78	—
	=	=	9	6	89	82	+
	Glukoselösung	=	6	5	98	66	—
	=	=	6	5	96	70	+

Adrenalinversuche: Die Wirkung des Adrenalins auf den Wasserhaushalt besteht in einer anfänglichen Hemmung der Harnsekretion mit nachfolgender Steigerung.[4]) Es läßt sich vermuten, daß auch die Wasser- und Elektrolytverteilung

nicht allein im Körpergewebe sich ändert, sondern auch im Blut; eine Kolloidverschiebung läge also im Bereich des Möglichen. Die zahlreichen diesbezüglichen Versuche lassen aber eine derartige Veränderung nicht erkennen, und es ist anzunehmen, daß auch das Adrenalin die Wasser- und Elektrolytverteilung hauptsächlich außerhalb des Blutserums bestimmt.

Tab. 5

bringt einen Teil der Versuchsergebnisse zur Darstellung.

No.	Art des Verdünnungsmittels	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in log. Tr. E.	Endpunkt in log. Tr. E.	Adrenalinzusatz
1	Kochsalzlösung	1	8	117	115	—
	=	— 2	8	117	115	+
	Glukoselösung	2	6	118	110	—
	=	1	6	117	111	+
2	Kochsalzlösung	14	4	132	85	—
	=	12	5	130	82	+
	Glukoselösung	21	5	134	61	—
	=	14	5	129	64	+
3	Kochsalzlösung	3	5	48	43	—
	=	7	5	51	46	+
	Glukoselösung	1	4	41	34	—
	=	3	4	43	35	+

Thyreoidea und Thymus: Unter dem Einfluß des Thyroxins wird nach Eppinger die Quellung der Körperkolloide verändert und die Diurese verstärkt, während das Inkret der Thymusdrüse in vieler Hinsicht als Antagonist des Schilddrüsenextraktes aufzufassen ist. Die Untersuchungen über den Ablauf der Kolloidpufferung unter der Einwirkung der beiden Inkrete zeigen eine völlige Uebereinstimmung der Inkret- mit den reinen Verdünnungskurven, wie sie in den beiden Tabellen 6a und 6b zum Ausdruck kommt. Wiederum ist also als wahrscheinlich anzusehen, daß weniger die Serumkolloide als vielmehr die Körperkolloide den Angriffspunkt für die Wirksamkeit der beiden Inkrete bilden.

Tabelle 6a

No.	Verdünnungsmittel	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in log. Tr. E.	Endpunkt in log. Tr. E.	Thyroxin zusatz
1	Kochsalzlösung	10	6	115	94	—
	=	11	6	117	89	+
	Glukoselösung	8	6	117	98	—
	=	7	6	122	103	+
2	Kochsalzlösung	— 9	6	115	94	—
	=	— 7	6	115	96	+
	Glukoselösung	—11	5	131	87	—
	=	— 6	5	118	98	+

Tabelle 6b

No.	Verdünnungsmittel	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhepunkt in log. Tr. E.	Endpunkt in log. Tr. E.	Zusatz von Thymoglandol
1	Kochsalzlösung	—18	6	102	54	—
	=	—20	6	112	71	+
	Glukoselösung	—13	5	122	46	—
	=	—10	5	115	41	+
1a	**Kontrollversuch zu Nr. 1**					
	Kochsalzlösung	—18	6	110	76	—
	=	—16	6	109	60	+
	Glukoselösung	—14	5	124	43	—
	=	— 5	5	124	43	+

Zwar fallen bei den Kurven gewisse Unterschiede auf, doch sind Gesetzmäßigkeiten nicht aus ihnen abzuleiten. Die bisher untersuchten Inkrete haben also keinen Einfluß auf die Dispersion der Serumkolloide.

Insulin: Das Insulin kann zwar wie die zuvor untersuchten Inkrete eine Wasserretention hervorrufen[4]), seine Bedeutung ist vor allem aber darin zu suchen, daß es zur Verbrennung des Zuckers im Körper notwendig ist. Im Reagenzglas verändert es aber den Blutzucker nicht, wie alle dahin angestellten Versuche ergaben. Es ist also möglich, daß das Insulin an den Körperzellen selbst angreift; es könnte aber auch sein, daß es den Blutzucker in eine andersartige Bindung überführt, die mit den gewöhnlichen Reduktionsmethoden nicht nachweisbar ist. Wenn man annimmt, daß

diese Bindung des Blutzuckers unter dem Einfluß des Insulins an die Kolloide des Blutserums erfolgt, so müßte der veränderte Ablauf der Kolloidpufferung davon Zeugnis geben. Aus diesem Grunde wurden Versuche mit tierischen, menschlichem normalem und Diabetikerserum ausgeführt, von denen einige in Tabelle 8 wiedergegeben sind. Die Versuche wurden in der üblichen Weise angestellt: das Serum wurde zur Hälfte mit physiologischer Kochsalz- bzw. Glukoselösung verdünnt und zum Teil mit 1/50 Vol. % Insolin versetzt. Von besonderem Interesse waren bei diesen Versuchen die Glukoseverdünnungen. Das Serum wurde wie üblich vor der Untersuchung zwei Stunden im Brutschrank belassen. Bei keiner der angestellten Proben ergab sich jedoch zwischen Insulin- und Verdünnungskurven ein bemerkenswerter Unterschied. Danach ist also anzunehmen, daß das Insulin innerhalb des Serums entweder überhaupt nicht wirksam ist, oder dass es hier Veränderungen setzt, die tyndallometrisch nicht faßbar sind.

Tabelle 7.

No.	Verdünnungsmittel	Art des Serums	Anfangspunkt in log. Tr. E.	Anstiegsbreite nach Zusatz HCl	Höhe- Endpunkt in log. Tr. E.		Insulinzusatz
1	Kochsalzlösung	tier.	7	5	110	45	—
	=	=	6	5	105	46	+
	Glukoselösung	=	9	5	100	25	—
	=	=	11	4	99	25	+
5	Kochsalzlösung	norm. menschl.	1	5	101	64	—
	=	= =	1	5	98	70	+
	Glukoselösung	= =	3	4	106	48	—
	=	= =	4	4	110	46	+
6	Kochsalzlösung	= =	84	5	136	98	—
	=	= =	85	5	137	105	+
	Glukoselösung	= =	82	5	137	94	—
	=	= =	82	6	137	99	+
9	Kochsalzlösung	Diab. Serum	76	5	135	110	—
	=	= =	80	5	135	111	+
	Glukoselösung	= =	79	5	149	106	—
	=	= =	78	5	154	94	+
10	Kochsalzlösung	= =	96	5	130	121	—
	=	= =	94	5	133	119	+
	Glukoselösung	= =	92	5	135	111	—
	=	= =	92	4	135	111	+

Die Kolloidpufferung bei Zusatz von Diuretika.

In der Richtung der angestellten Untersuchungen lag es, die Kolloidpufferung bei Zusatz von Diuretika festzustellen. Hier konnte evtl. ein Weg gefunden werden, um den komplizierten Vorgang der Diurese weiter zu erklären, als es bisher möglich war. Zahlreiche frühere Versuche haben sich damit befaßt, durch Messung der kolloidalen Eigenschaften (Viskosität, kolloidosmotischer Druck) des Serums die Wirkungsweise der Diuretika zu erklären. Doch blieben diese Bemühungen bisher erfolglos. Es wurde also der Versuch unternommen, mit Hilfe der Kolloidpufferung evtl. bestehende Verschiebungen festzustellen. Als typische Vertreter der Diuretika wurden Coffein und Salyrgin gewählt. Von Coffein[5]) ist bekannt, daß es die Fällbarkeit des Euglobulins im Serum weitgehend ändert und dadurch eine Hemmung der Gerinnung sowie der Hämolyse bedingt. Hier war also von vorn herein eine Veränderung der Kolloidpufferung zu erwarten, denn diese Umlagerung im Serumeiweis muß notwendig in dem Kurvenverlauf zum Ausdruck kommen.

Tabelle 8 bringt eine Uebersicht über einen Teil der Versuchsergebnisse. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei der Prüfung der Inkrete, also ein Zusatz von 1/50 Vol. % Coffein — bezw. Salyrgan. Die Tabelle bringt nur einen Teil der Coffeinversuche zur Darstellung, während zur Charakterisierung der Salyrganwirkung im Serum die nächste Abbildung dient.

Tabelle 8

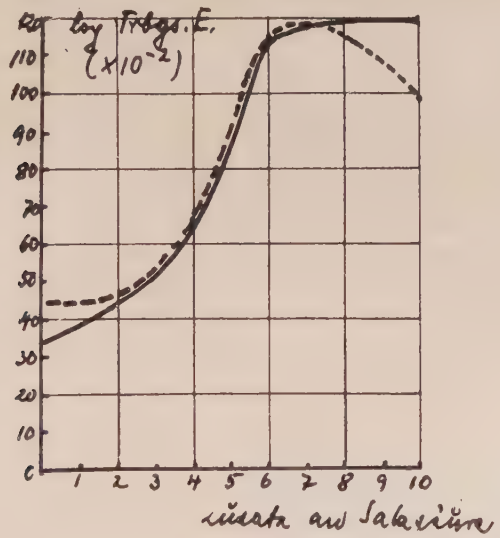
No.	Verdünuungs-mittel	Anfangs-punkt in log. Tr. E.	Anstiegs-breite nach Zu-satz HCl	Höhe-punkt in log. Tr. E.	End-punkt in log. Tr. E.	Coffein-zusatz
1	Kochsalzlösung	48	4	157	125	—
	"	48	6	152	146	—
	Glukoselösung	66	4	151	127	—
	"	58	5	151	144	+
5	Kochsalzlösung	18	6	135	100	—
	"	11	6	136	114	—
	Glukoselösung	17	6	133	71	—
	"	10	5	135	87	+

Die Zahlen lassen erkennen, daß der Einfluß des Coffeins auf das Serum auch die Kolloidpufferung betrifft. Auffällig

ist, daß hier auch wieder eine Kreuzung der Kurven eintritt, wie sie bereits bei den Tuberkulinversuchen zu erkennen war. Es findet also unter dem Coffeinzusatz eine Verhinderung der Wiederauflösung statt — was kolloidchemisch einer Stabilisierung gleichkommt. Das ist also ein Vorgang, der im wesentlichen der Fällungsverschiebung entspricht, wie sie bei der Ausfällung von Salzen zustande kommt. Es ist also eine deutliche Beeinflussung der Serumkolloide durch das Coffein festzustellen. Man könnte einwenden, daß die im Versuch gewählte Konzentration des Diuretikums höher ist als die Konzentration, mit der man im Organismus rechnen muß. Trotzdem haben diese Versuche insofern Bedeutung, als diese Fällungsverschiebung die Richtung angibt, in der sich auch bei geringerer Coffeinkonzentration die Kolloidverschiebungen bewegen müssen.

Prinzipiell ähnliche Unterschiede in der Kolloidpufferung werden bei den Salyrgankurven deutlich, die anschließend besprochen werden.

Abbildung 3



Pufferung bei Salyrganzusatz

——————— Serum mit Salyrgan versetzt
– – – – – – – – – Kontrolle Serum unbehandelt

Abb. 3 stellt eine typische Salyrgankurve dar; eine „Verdünnungskurve“ ist zum Vergleich eingezeichnet. Während die Verdünnungskurve einen Abfall zeigt, verläuft im Gegensatz dazu die Salyrgankurve von ihrem Höhepunkt aus in einer Parallele zur Abszisse. Auch die übrigen Salyrgankurven zeigen dieses Bild; nur in wenigen Fällen ist ein Absinken der Kurve von ihrem Höhepunkt zu erkennen, das dann nur wenigen log Tr. E. entspricht. Bei den Kochsalzverdünnungen fällt auf, daß außer in einem Fall der Anfangswert der Salyrgankurven tiefer liegt; die Differenz beträgt 2—33 log. Tr. E. In den beiden Fällen, in denen das Serum mit physiologischer Glukoselösung verdünnt wurde, liegt er allerdings noch tiefer. Makroskopisch wurde der Unterschied zwischen dem mit Kochsalzlösung verdünnten und dem außerdem mit Salyrgan beschickten Serum bereits dadurch kenntlich, daß das Serum unter Salyrganeinwirkung eine auffallende Klarheit aufwies. (Es wurde mit dem verdünnten Serum im Brutschrank belassen und kam dann gleichzeitig mit ihm zur Untersuchung.) Beim Bürettieren mit Salzsäure trübten sich dann beide Serumproben gleich rasch. Die anfangs bestehende Klarheit des Serums ist um so bedeutungsvoller, als sie bei den vorhergehenden Versuchen nirgends in Erscheinung trat. Es ist also anzunehmen, daß Salyrgan und Coffein die Serumkolloide doch in verschiedener Weise beeinflussen, wenn auch beide Diuretika die Phasenpufferung gleichsinnig verändern. Vermutlich hängt diese Aenderung in den Serumkolloiden ursächlich mit der Diurese zusammen. Allerdings gibt sie keinen Einblick in die Vorgänge, wie sie sich im menschlichen Körper abspielen. Die Versuche haben trotzdem eine gewisse Bedeutung, als sie zum ersten Mal den Nachweis dafür erbringen, daß die Diurese mit Veränderungen in der Quellbarkeit bzw. Fällbarkeit der Serumkolloide einhergeht.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

1. Der Ablauf der Kolloidpufferung im halb verdünnten Serum ist praktisch mit der im nativen Serum erfolgenden Reaktion gleichzusetzen. Dabei spielt die Wahl des Verdünnungsmittels — es kommen physiologische Kochsalz- und Glukose- sowie Ringerlösung in Frage — keine wesentliche Rolle. Bei Verdünnung mit Ringer- und physiologischer Kochsalzlösung decken sich die

Ergebnisse nahezu, während bei der Verdünnung mit physiologischer Glukoselösung Unterschiede festzustellen sind, hervorgerufen durch die mangelnde elektrolytische Dissoziation. Bei 4- und 5-facher Verdünnung mit Kochsalzlösung treten bereits stärkere Unterschiede gegenüber den Nativkurven auf, die bei 10-facher Verdünnung noch deutlicher werden. Die Glukoseverdünnung setzt bereits bei 4- und 5-facher Verdünnung ganz erhebliche Verschiebungen.

2. Die Kolloidpufferung verläuft bei aktiver Tuberkulose im halbverdünnten Serum annähernd in der gleichen Weise wie im nativen Serum. Dieser Nachweis wird in 24 vergleichenden Untersuchungen geführt. Diagnostisch ist also die Methode von Klinke-Hensel auch in Serumverdünnungen verwertbar.

3a Hypophysenpräparate ändern den Ablauf der Kolloidpufferung nicht mit Ausnahme des Hypophysins, das aber auch nur einen ganz geringen Einfluß hat.

3b Die Verschiebungen, die Adrenalin in der Wasser- und Elekrolytverteilung des Körpers hervorruft, kommen in der Kolloidpufferung nicht zum Ausdruck.

3c Thyroxin und sein Antagonist Thymoglandol haben ebenfalls keinen Einfluß auf die Fällbarkeit der Serumkolloide. Daher verlaufen die Verdünnungskurven gleichsinnig mit den Inkretkurven.

3d Das gleiche Verhalten zeigt das Inkret des Pankreas; eine veränderte Kolloidpufferung ist weder im normalen noch im Diabetikerserum nach Insalin- und Traubenzuckerzusatz festzustellen.

4. Coffein und Salyrgan haben einen ganz deutlichen Einfluß auf die Kolloidpufferung. Trotzdem Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Diuretika bestehen, fällt die gleichsinnige Aenderung der gezeichneten Kurven auf. Sie läßt den Schluß zu, daß Coffein- und Salyrganwirkung auf die Serumkolloide im wesentlichen gleich sind. Vermutlich stehen die Kolloidveränderungen mit der Diurese im Zusammenhang.

Literaturverzeichnis

1. Klinke K.: Z. exp. Med. Bd. 76, S. 476, Jg. 1931.
2. Klinke K. und Hensel Hildegard: Münch. med. W. 1931, Heft 52.
3. Klinke K.: Biochem. Zeitschr. Bd. 197, S. 381, Jg. 1928.
4. Zit. nach Klinke K.: Der Mineralstoffwechsel. Physiologie und Pathologie. Leipzig und Wien, Fr. Deuticke, 1931.
5. Klinke K.: Kl. Wochenschr. Jg. 1929, Bd. 2, S. 1363.

Lebenslauf

Verfasserin der vorliegenden Dissertation wurde am 15. April 1905 zu Frankenstein i. Schl. geboren. Nach zweijährigem Besuch der Volksschule besuchte ich die höhere Mädchenschule am selben Ort, die später zum Lyzeum ausgebaut wurde. Hier erwarb ich Ostern 1921 das Abschlußzeugnis des Lyzeums. Nach einjährigem Privatunterricht bestand ich die Aufnahmeprüfung in die Unterprima des Realgymnasiums der Ursulinen zu Breslau, wo ich Ostern 1924 das Abiturium bestand. Im Mai 1925 begann ich das medizinische Studium an der Universität zu München, wo ich am Ende des Sommersemesters 1927 das medizinische Vorexamen ablegte. Die nächsten beiden Semester besuchte ich die Universität Würzburg, um im dritten klinischen Semester an der Universität Wien zu studieren. Die letzten beiden Semester studierte ich an der Universität Breslau, wo ich im Sommer 1930 das medizinische Staatsexamen ablegte. Das praktische Jahr begann ich an der Universitätspoliklinik der Universität zu Breslau unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Bittorf. Anschließend arbeitete ich an der Orthopädischen Klinik der Universität Breslau unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Weil. Den Rest des praktischen Jahres verbrachte ich am Städtischen Krankenhaus von Pirmasens (Pfalz), wo ich auf der inneren Abteilung tätig war. Nach Ablauf des praktischen Jahres arbeitete ich in der Kinderklinik der Universität Breslau; hier war ich mit experimentellen Arbeiten für meine Dissertation beschäftigt. Seit 1. November 1931 bin ich an der Gynäkologischen Abteilung des St. Elisabethkrankenhauses in Breslau-Gräbschen tätig.

Antonie Lowag